



TITLE:

膜タンパク質小胞体ストレスセンサーATF6を基質とした小胞体関連分解因子SEL1LおよびEDEEMの機能解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

堀本, 賢

CITATION:

堀本, 賢. 膜タンパク質小胞体ストレスセンサーATF6を基質とした小胞体関連分解因子SEL1LおよびEDEEMの機能解析. 京都大学, 2016, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19543>

RIGHT:

京都大学	博 士（理 学）	氏名	堀本 賢
論文題目	膜タンパク質小胞体ストレスセンサーATF6を基質とした小胞体関連分解因子SEL1L およびEDEEMの機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>分泌タンパク質や膜タンパク質は小胞体膜結合性リボソームで合成された後、小胞体において正しい立体構造を獲得し、それぞれの局在場所へ輸送されていく。小胞体にストレスがかかりタンパク質折りたたみ介助機能が低下した時などに生じる、どうしても立体構造が異常なタンパク質は、小胞体関連分解（ERAD: endoplasmic reticulum associated degradation）により分解処理を受ける。ERADは、小胞体内で構造異常タンパク質を認識し、これを小胞体から細胞質へ逆行輸送し、小胞体膜に存在するユビキチン・リガーゼによりユビキチン化した後、細胞質のプロテアソームによって分解するという一連の経路を指している。ERADにはさまざまな因子が関与するが、分解を受ける基質の種類によって関わる因子に違いがあることが示唆されている。また、糖タンパク質と非糖タンパク質では分解経路が異なり、糖タンパク質のERADでは、高マンノース型糖鎖がマンノース 9 個→マンノース 8 個→マンノース 7 個とトリミングされて、α 1, 6結合のマンノースが露出することによって分解に導かれると考えられている。本研究では、膜タンパク質小胞体ストレスセンサーであるATF6に着目し、ERADの分解基質としての特徴を解析した。</p>			
<p>第1章では、ERAD因子SEL1L（小胞体膜貫通型タンパク質であり、E3ユビキチン・リガーゼであるHRD1のパートナータンパク質）に着目し、例外的に相同組換え効率が高いニワトリ細胞DT40におけるSEL1Lノックアウト細胞を用いてATF6の分解に対する影響を調べた。これまでSEL1Lは、可溶性タンパク質ERAD基質の分解には必須であるが、膜タンパク質ERAD基質の分解に対してはあまり寄与していないと考えられた。しかしながら、ATF6の分解がSEL1Lノックアウト細胞において大きく遅れたことから、ATF6は膜タンパク質ERAD基質としては新しい分類に属することが分かった。また、SEL1Lによる分解にはATF6の小胞体内腔部位が重要であること、ATF6の小胞体内腔領域はトポロジー（I型の膜タンパク質かII型の膜タンパク質か）によらずSEL1L依存性を持たせること、糖タンパク質であるATF6の分解においても高マンノース型糖鎖のトリミングが重要な役割を果たすことが分かった。さらに、膜タンパク質ERAD基質は分解のSEL1Lおよびタンパク質に結合している高マンノース型糖鎖のトリミングの必要性に従って、新たに3つの分類ができることが分かった。すなわち、①マンノーストリミング、SEL1Lともに必要でない（class I）、②マンノーストリミングは必要だがSEL1Lは必要でない（class II）、③マンノーストリミング、SEL1Lともに必要（class III）という3通りの分類である。よって、膜タンパク質ERADはこれまで考えられていた以上に複雑な経路により分解処分されていると考えられた。</p>			

第2章では、3つホモログが存在するERAD因子EDEMI (EDEMI/EDEMI2/EDEMI3) に着目し、それぞれのシングルノックアウトおよびトリプルノックアウトDT40細胞を用いてATF6の分解に対する影響を調べた。内在性のATF6およびトランスフェクションにより導入されたヒトATF6の分解は、EDEMI/2/3トリプルノックアウト細胞でほぼ完全に抑制された。一方、3箇所の糖鎖付加部位に変異を導入したヒトATF6変異体の分解にはEDEMI/2/3トリプルノックアウトは影響を与えなかった。よって、ATF6の糖鎖トリミング依存的な分解にEDEMI/2/3が関わっていると考えられた。それぞれのシングルノックアウト細胞における内在性のATF6およびトランスフェクションにより導入されたヒトATF6の分解を調べた結果、3つのEDEMIの中でEDEMI2が特に分解に対する寄与が大きいこと、次いでEDEMI3の寄与が大きいことが分かった。また、これまでEDEMI1、EDEMI3はマンノーストリミング活性を持つのに対し、EDEMI2は活性を持たないと考えられていたが、EDEMI2ノックアウト細胞でATF6のバンドサイズが明確に大きいことが分かり、EDEMI2がマンノーストリミングに関与する可能性が示唆された。これらのことから、ATF6の分解においてマンノーストリミングが重要であることが示唆された。

以上より、ATF6はこれまで知られていた基質とは異なる特徴を有しており、膜タンパク質ERADは今まで考えられていた以上に複雑なメカニズムにより分解されていることがわかった。また、ATF6は小胞体ストレスセンサーとして重要であるのみならず、ERADのモデル基質としてユニークで有用なタンパク質であることが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

従来、ERADの解析は酵母細胞および哺乳類動物細胞を用いて行われて来た。酵母では遺伝子破壊が容易なため、しっかりとした結果が得られている。これに対して、哺乳動物細胞では遺伝子破壊が困難なため、より簡便な遺伝子ノックダウンや過剰発現によって解析が行われて来た。しかし、ノックダウンでは、残存しているタンパク質の影響を無視できず、オフターゲット効果も心配される。過剰発現した細胞で得られた結果が本来の細胞内の出来事を反映している保障はない。

堀本氏の研究結果は、ニワトリDT40細胞が例外的に高い相同組換え効率を有していることに着目して、遺伝子破壊によってERADを解析した点が独創的である。SEL1Lノックアウト細胞とマンノーストリミング阻害剤を用いた解析の結果、膜タンパク質ERAD基質を新たに3つのカテゴリーに分類することに成功し、ERAD研究分野に大きなインパクトを与えた。また従来、マンノース活性を持つのか、持たないレクチンとして機能するのかで論争が行われてきたEDEMIファミリータンパク質がマンノシダーゼとして機能することを示唆する極めて重要な結果を得た。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成28年1月13日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。